

ОБЪЕДИНЕННЫЙ ИНСТИТУТ ЯДЕРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ
ЛАБОРАТОРИЯ НЕЙТРОННОЙ ФИЗИКИ ИМ. И. М. ФРАНКА

На правах рукописи

Е. Яшина

Яшина Екатерина Геннадьевна

**Исследование структурной организации хроматина в ядре
биологической клетки методами малоуглового рассеяния
нейтронов**

специальность 01.04.07 – Физика конденсированного состояния

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

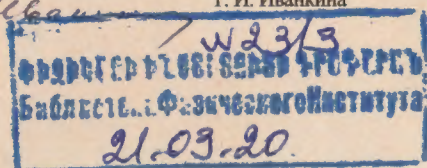
Дубна – 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт».

- Научный руководитель** – **Григорьев Сергей Валентинович**, доктор физико-математических наук, старший научный сотрудник, заместитель директора по международной деятельности, исполняющий обязанности заведующего Отделом исследования конденсированного состояния Петербургского института ядерной физики им. Б. П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт».
- Официальные оппоненты** – **Авдеев Михаил Васильевич**, доктор физико-математических наук, начальник сектора нейтронной оптики, Лаборатория нейтронной физики им. И. М. Франка Объединённого института ядерных исследований.
- Волков Владимир Владимирович**, доктор химических наук, ведущий научный сотрудник, Лаборатория рефлектометрии и малоуглового рассеяния, Институт кристаллографии им. А. В. Шубникова РАН.

С электронной версией диссертации можно ознакомиться на официальном сайте Объединённого института ядерных исследований в информационно-телекоммуникационной сети «Интернет» по адресу: <http://dissertations.iinr.ru>. С печатной версией диссертации можно ознакомиться в научно-технической библиотеке ОИЯИ (г. Дубна, Московская область, ул. Жолио-Кюри, д. 6).

Ученый секретарь диссертационного совета ОИЯИ
по физике конденсированных сред — ОИЯИ.04.01.2019.П,
кандидат физико-математических наук *Иванкина*



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

При всех впечатляющих успехах биологии и генетики за последние десятилетия, определение структурной организации хроматина в ядре эукариотической клетки остается вопросом, до конца нерешенным. Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) — это невероятно длинная полимерная молекула, находящаяся в очень компактном ядре клетки. Многократное сокращение линейных размеров ДНК обеспечивается её упаковкой в хроматин с помощью специальных архитектурных белков. Например, если распаковать геном человека, то его длина составит 2 метра, в то время как диаметр ядра меньше 10 микрон, а самый большой, известный на данный момент, геном в 200 раз больше, чем у человека (*Amoeba dubia*).

Кроме хранения генетической информации, в период интерфазы в ядре клетки осуществляются сложные процессы биосинтеза ДНК, а также считывание информации о структуре белка. Все эти функции осуществляются за рекордно короткое время. Это приводит к тому, что нить ДНК должна очень быстро распаковываться, чтобы нужный участок гена мог быть считан. С другой стороны макромолекула ДНК уложена в очень небольшом объеме, порядка нескольких микрон. Предполагается, что это связано с принципами транспорта, которые напрямую связаны и определяются особенностями структурной укладки хроматина. Понимая, как работают, те или иные гены в составе ДНК, мы все еще не знаем всех принципов упаковки хроматина в ядре.

С одной стороны, структурная организация хроматина приводит в высшей степени его компактности, а с другой, к способности быстрой распаковки ДНК. Важно отметить, что зачастую именно эти два фактора формируют структурный и функциональный дизайн организмов. Первый из них - это стремление к максимальной метаболической способности, поскольку он производит энергию и вещества, необходимые для поддержания и воспроизведения жизни. Достигается это за счет увеличения площади поверхности, через которую происходит обмен ресурсами с окружающей средой. Второй фактор - увеличение внутренней эффективности за счет уменьшения расстояния, на которое транспортируются материалы, и, следовательно, время, необходимое для транспорта [1]. Эта тенденция к уменьшению приводит к компактизации живой системы, иными словами, к минимизации объема. Эти два фактора являются противоположными друг другу, и морфология живого организма, формирующегося под влиянием двух противоборствующих факторов и принимает наиболее выгодную для выживания форму. Кроме того, простота реализации законов воспроизведения является третьим, не менее важным свойством, к которому стремится жизнь. В природе структуры зачастую

генерируются многократным повторением одного и того же морфогенетического механизма, например, ветвления. Наиболее наглядной реализацией этого принципа является дерево. Оно растет таким образом, что на каждом следующем уровне ветвления, сумма квадратов радиусов веток равна квадрату радиуса ветви, из которой произошло ветвление. Рекуррентное свойство, описывающее рост дерева было замечено еще Леонардо Да Винчи [2].

Упаковка ДНК происходит в несколько этапов. Наиболее изученной считается нуклеосомная структура интерфазного хроматина, в то время как его крупномасштабная структура на сегодняшний момент достоверно неизвестна. Точно известно, что двуспиральная нить ДНК наматывается на специальные белки гистоны, тем самым компактизуясь в 7 раз, образуя нуклеосомы. Что касается следующих масштабных уровней, то принципы их пространственной организации активно обсуждаются на сегодняшний день. Одним из наиболее достоверных и информативных методов исследования субмикронных объектов является малоугловое рассеяние нейтронов (МУРН), позволяющее проводить исследования в диапазоне размеров от 1 нм до 1 мкм. С помощью МУРН можно узнать размер, форму и внутреннюю структуру нанобъектов. В отличие от микроскопии, методы рассеяния дают информацию от всего объема образца, что делает их совершенно необходимыми для изучения трехмерных объектов.

Высокое разрешение этих методов достигается коллимацией падающего на образец пучка и большим расстоянием от образца до детектора, обеспечивающее высокое угловое разрешение установки. В результате, системой коллиматоров и монохроматором вырезается до 99% интенсивности нейтронного пучка, испускаемого источником, а сами установки могут достигать в длину 40 метров. Эти особенности малоугловых нейтронных установок налагают высокие требования на нейтронные источники и установки, такие как высокая интенсивность нейтронных пучков и большие размеры нейтронно-водных залов.

Использование нейтронного спинового эха в малоугловом рассеянии нейтронов позволяет добиться высокого разрешения без коллимации падающего пучка и получать информацию о малых углах рассеяния на фоне прямого пучка, прошедшего через образец. Этот метод получил название спин-эхо малоуглового рассеяния нейтронов (СЭМУРН) и дал возможность исследовать материалы в широком диапазоне масштабов - от 20 нм до 20 мкм [3, 4]. Техника СЭМУРН является одной из самых изящных реализаций метода ультрамалоуглового (УМУРН) рассеяния нейтронов и оказалась комплементарной методу МУРН поскольку она, во-первых, расширяет пространственный диапазон исследования и, во-вторых, позволяет исследовать аналог корреляционной функции рассеивающего объекта в реальном пространстве, которая является преобразованием Ханкеля от сечения

рассеяния. Метод СЭМУРН всегда дает информацию о корреляционной длине исследуемого объекта, которую иногда не удастся определить из классического МУРН. Использование метода СЭМУРН позволило исследовать структуру хроматина на масштабах порядка размера самого ядра. С помощью методов СЭМУРН и МУРН получена структурная информация об общих принципах организации хроматина на всех уровнях организации.

Цель и задачи исследований

Целью работы является исследование структурной организации хроматина в ядре биологической клетки методами малоуглового рассеяния нейтронов.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- 1) Провести классификацию фрактальных объектов конечных размеров с помощью метода малоуглового рассеяния нейтронов.
- 2) Исследовать структурную организацию хроматина в ядрах куриных эритроцитов и в ядрах клеток HeLa методами МУРН и спин-эхо МУРН.
- 3) Провести сравнение структурной организации хроматина в делящихся и неделящихся эукариотических клетках, обнаружить общие и различающиеся характеристики.

Научная новизна работы

1. Впервые методом СЭМУРН была исследована структурная организация хроматина в ядре живой клетки на масштабах порядка микрометра. Разработана методика исследования ядра клетки методом СЭМУРН. Эта методика в будущем может быть применена к изучению бесконечного многообразия биологических клеток и их возможному изменению под влиянием внешних факторов.

2. Для описания крупномасштабной организации хроматина в ядрах куриных эритроцитов и клеток HeLa разработана модель логарифмического фрактала, характеризующегося мерой $\mu(r) = r^{Df} \ln^{\Delta}(1/r)$ с $Df=3$ и $\Delta=-1$, который, по видимому, является отличительной характеристикой живых систем.

3. Впервые показано, что модель фрактальной глобулы не удовлетворяет экспериментальным данным малоуглового рассеяния нейтронов на ядрах биологических клеток, в то время как, модель логарифмического фрактала хорошо описывает экспериментальные данные МУРН, а, следовательно, и является хорошим приближением для описания крупномасштабной структуры хроматина.

4. Впервые методами МУРН и СЭМУРН показано, что структурная организация хроматина в ядрах клетки HeLa, аналогична двухуровневой фрактальной организации хроматина в ядрах куриных эритроцитов.

Научная и практическая значимость работы

Установленные в результате выполнения данной работы закономерности вносят значительный вклад в современные представления о фрактальной организации хроматина в интерфазном ядре биологической клетки. Полученные экспериментальные результаты могут быть востребованы в научных лабораториях, занимающихся проблемами генетики и клеточной биологии, и в будущем могут быть полезны при разработке лекарств против онкологии.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Пограничный случай перехода от объемного к поверхностному фракталу, характеризующийся зависимостью интенсивности рассеяния от переданного импульса $I(Q) \sim (1+(Q\xi)^2)^{-3/2}$, соответствует СЭМУРН функции $G(z)$ равной убывающей экспоненте $\exp(-z/\xi)$, а корреляционная функция в области фрактального поведения в этом случае пропорциональна $\ln(\xi/r)$ и имеет необычное масштабное свойство $\gamma(r/a) = \gamma(r) + \ln(a)$, т. е. уменьшение масштаба дает аддитивную добавку к корреляционной функции, а не мультипликативную, как в случае объемного фрактала.

2. Наднуклеосомная организация хроматина в ядрах куриных эритроцитов и ядрах HeLa представляет собой двухуровневую фрактальную структуру. Мелкомасштабный фрактальный уровень описывается моделью объемного фрактала с размерностью $D_f = 2.46 \pm 0.01$ в ядрах куриных эритроцитов и $D_f = 2.41 \pm 0.01$ в ядрах HeLa. Крупномасштабный фрактальный уровень описывается моделью логарифмического фрактала.

3. Структура логарифмического фрактала в ядрах HeLa простирается на две декады по шкале размеров, в то время как объемный фрактал распространяется только на одну. В ядрах куриных эритроцитов - наоборот: логарифмический фрактал существует в пределах одной декады, а объемный фрактал распространен на две. В отличие от ядер куриных эритроцитов, ядра HeLa имеют тенденцию агломерировать со временем. При этом ядра HeLa глубоко на 1-2 микрона проникают в соседнее ядро в процессе агломерации.

4. Показано, что модель фрактальной глобулы, пространственная структура которой описывается трехмерной кривой Гильберта (Пеано или другой заполняющей пространство кривой) не удовлетворяет экспериментальным данным малоуглового рассеяния нейтронов на ядрах биологических клеток. Напротив, модель логарифмического фрактала хорошо описывает экспериментальные данные МУРН, а, следовательно, и является хорошим приближением для описания крупномасштабной организации хроматина в ядре биологической клетки, находящейся в интерфазном состоянии.

Апробация работы

Основные результаты работы были представлены на научных семинарах в ФГБУ ПИЯФ НИЦ КИ (научные семинары ОИКС), СПбГУ, а также на следующих российских и международных конференциях:

- ✓ на конференциях по использованию рассеяния нейтронов и синхротронного излучения в конденсированных средах "РНИСИ-КС -2014 и РНИКС-2018;
- ✓ на четырех совещаниях по малоугловому рассеянию нейтронов "МУРомец" (2014, 2015, 2016, 2017);
- ✓ на пяти школах ПИЯФ НИЦ КИ по физике конденсированного состояния "ФКС" (2015, 2016, 2017, 2018, 2019);
- ✓ на IV ежегодном молодежном научном форуме "Open Science 2017";
- ✓ на двух международных научных школах "RACIRI Summer School" (2015, 2016);
- ✓ на европейской научной школе "HERCULES European School 2016";
- ✓ на Международной конференции "PNCMI 2016" по рассеянию поляризованных нейтронов в конденсированных средах;
- ✓ на трех школах по физике поляризованных нейтронов "ФПН" (2015, 2016, 2018);
- ✓ на европейской конференции по нейтронному рассеянию "ECNS 2019"

Публикации по теме диссертации

Основные результаты по теме диссертации опубликованы в 5 работах в изданиях, рекомендованных ВАК (4 из которых индексируются международными системами цитирования Web of Science и Scopus [5-8], и 1 индексируется национальной библиографической базой данных научного цитирования РИНЦ [9]).

Личный вклад автора

Все представленные результаты получены автором работы или при его непосредственном участии. Автор разработал и расширил классификацию фрактальных объектов основанную на результатах метода малоуглового рассеяния нейтронов, провел все эксперименты по МУРН и принимал активное участие в экспериментах по СЭМУРН, обработал, проанализировал и интерпретировал все приведенные данные, а также подготовил научные публикации и доклады.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения. Полный объем диссертации составляет 120 страниц с 32 рисунками и 1 таблицей. Список литературы содержит 76 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обсуждается актуальность исследований, проводимых в рамках диссертационной работы, формулируются цели и задачи работы, определены объекты

исследований. Обосновывается научная новизна и практическая значимость полученных результатов. Описывается структура и содержание работы.

В первой главе представлен обзор современного представления об организации хроматина в ядре интерфазной биологической клетки. Глава состоит из двух разделов. В первом изложен современный взгляд на мелкомасштабную организацию хроматина, а во втором на крупномасштабную, соответственно. Многократное сокращение линейных размеров ДНК обеспечивается её упаковкой в хроматин с помощью специальных «архитектурных» белков. Упаковка ДНК происходит в несколько этапов. Наиболее изученной считается нуклеосомная структура интерфазного хроматина, в то время как его крупномасштабная структура на сегодняшний момент достоверно неизвестна. На сегодняшний момент наиболее популярная модель, описывающая трехмерную конфигурацию упаковки хроматина в ядре клетки - модель складчатой или фрактальной глобулы. В пятой главе мы подробно рассматриваем модель фрактальной глобулы и модель логарифмического фрактала, разработанной в рамках данного исследования и сравниваем возможность их применимости для описания результатов МУРН на ядрах биологических клеток.

Во второй главе описаны основные методы исследования, а также процесс приготовления образцов ядер клеток. Для аттестации целостности и оценки степени монодисперсности выделенных ядер использовалась проточная цитометрия и конфокальная микроскопия. Основными методами исследования в диссертационной работе были методы нейтронного рассеяния, а именно, классическое малоугловое рассеяние нейтронов, ультрамалоугловое рассеяние нейтронов и спин-эхо малоугловое рассеяние нейтронов, которые позволили получить структурную информацию об организации хроматина в ядре биологической клетки на масштабах от нескольких нанометров до нескольких микрометров.

В третьей главе показаны недостатки и противоречия существующей концепции рассеяния на фрактальных объектах, сформировавшейся в конце XX века. Представлен подход для расчета корреляционной функции, основанный на анализе сечения рассеяния.

В этом подходе профиль сечения рассеяния нейтронов рассматривается как наблюдаемое свойство фрактальной частицы. В модели учитываются два основных параметра частицы: конечный размер ξ и степень ее фрактальности D , детектируемые через призму малоуглового нейтронного рассеяния. Описание охватывает в единой картине поверхностные и объемные фракталы, а также случай, соответствующий закону рассеяния $d\sigma/d\Omega \sim Q^{-3}$. Корреляционная функция $\gamma(r)$ для объемных и поверхностных фракталов описывается общим выражением

$$\gamma(r) = \frac{2}{\Gamma(\frac{D}{2}-1)} \left(\frac{r}{2\xi}\right)^{(D-3)/2} K_{(D-3)/2}\left(\frac{r}{\xi}\right), \quad (1)$$

где $\Gamma(x)$ - Гамма функция и $K_n(x)$ - функции Макдональда n -ого порядка (Рис.1). При $2 < D < 3$ корреляционная функция соответствует объемному фракталу с $D = D_m$, при $D = 3$ логарифмическому, при $3 < D < 4$ поверхностному с $D = 6 - D_s$ (D_m и D_s - фрактальные

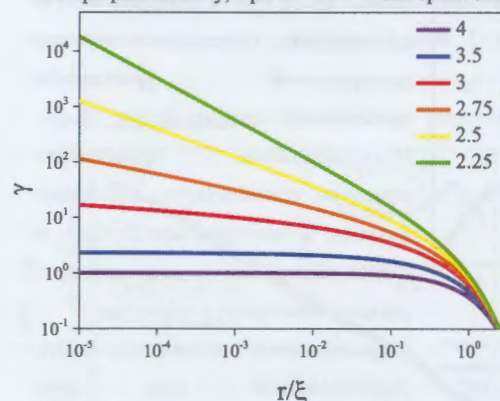


Рис.1 Корреляционная функция при разных значениях показателя степенной функции в сечении малоуглового рассеяния $D = 4, 3.5, 3, 2.75, 2.5, 2.1$ в двойном логарифмическом масштабе.

размерности объемного и поверхностного фракталов). Кроме того, корреляционные функции для неограниченных фракталов, как объемных, так и поверхностных совпадают с асимптотикой полученного выражения Ур.(1) при $r/\xi < 1$, где ξ — корреляционная длина частицы. Также получено выражение для одномерной корреляционной функции $G(z)$, которая

измеряется в методе спин-эхо МУРН, которое описывается аналогичным выражением, со сдвигом индекса функции Макдональда и показателя степенной функции на $1/2$. Результаты данной главы опубликованы в работе [9].

В четвертой главе представлены результаты исследования организации хроматина в ядрах куриных эритроцитов. Интенсивность малоуглового рассеяния нейтронов в диапазоне переданных импульсов $[10^{-2} \div 10^{-1}] \text{ nm}^{-1}$ описывается степенной функцией $I(Q) \sim Q^{-D}$ со степенью $D=2.46 \pm 0.01$ (Рис. 2). Интенсивность рассеяния нейтронов диапазоне переданных импульсов $[10^{-3} \div 10^{-2}] \text{ nm}^{-1}$ также имеет степенную зависимость со степенью $D=3.005 \pm 0.005$ (Рис. 2). Различие между степенями, обнаруженными в разных диапазонах по переданному импульсу Q , приводит к заключению о том, что фрактальная структура ДНК в ядре меняет свой характер при переходе от малого масштаба (десятки нанометров) к большему масштабу (сотни нанометров).

Для исследования крупномасштабной структурной организации хроматина в ядре живой клетки был использован метод спин-эхо малоуглового рассеяния нейтронов (СЭМУРН). На Рис.3 представлены результаты измерения поляризации $P(z)$ на ядрах куриных эритроцитов и, извлеченная из нее, СЭМУРН корреляционная функция $G(z)$. Экспериментальные данные демонстрируют экспоненциальный закон $G(z) = \exp(-z/\xi)$ для функции СЭМУРН, где $\xi = (3.29 \pm 0.07) \cdot \mu\text{m}$ — корреляционная длина исследуемого ядра.

Экспоненциальная функция СЭМУРН соответствует кубическая зависимость сечения рассеяния нейтронов в пространстве переданных импульсов и логарифмической корреляционной функции $\gamma(r) \sim \ln(\xi/r)$ при $r/\xi < 1$ (в области фрактального поведения).

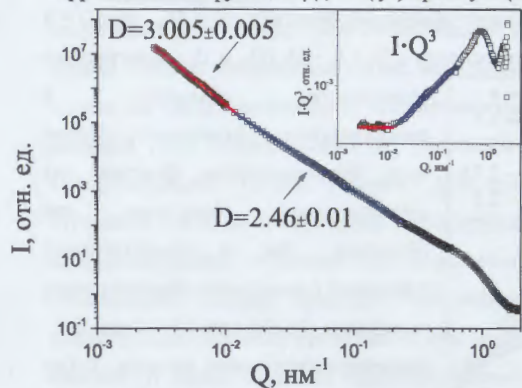


Рис.2 Малоугловое рассеяние нейтронов на ядрах куриных эритроцитов. Интенсивность рассеяния нейтронов в диапазоне переданных импульсов $10^{-3} + 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$ — данные установки TPA LLB, Сакле, Франция. Интенсивность рассеяния нейтронов в диапазоне переданных импульсов $10^{-2} + 10^0 \text{ nm}^{-1}$ — данные установки PA20 LLB, Сакле, Франция.

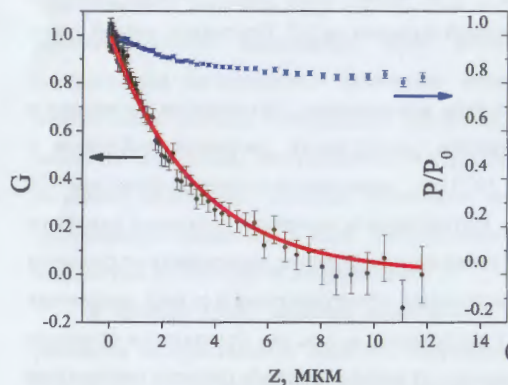


Рис.3 Изменение поляризации P/P_0 и СЭМУРН сигнал G в зависимости от спин-эхо длины z на ядрах куриных эритроцитов. Данные демонстрируют экспоненциальный закон для функции $G(z) = (\exp(-z/\xi))$, $\xi = (3.3 \pm 0.07) \cdot 10^3 \text{ nm}$.

механизмам целевого поиска ядерных белков, таким как транскрипция. С другой стороны, логарифмический фрактал является более компактным, чем объемный фрактал, и поэтому эффективность взаимодействий между удаленными геномными локусами повышается за

Имеющиеся экспериментальные данные по МУРН и спин-эхо МУРН представляют сложную картину двухуровневой фрактальной организации хроматина в ядре. Мелкомасштабная фрактальная структура соответствует объемному фракталу с размерностью $D_F = 2.46$, а крупномасштабная соответствует логарифмическому фракталу с корреляционной функцией $\gamma(r) \sim \ln(\xi/r)$.

Характеристики этих двух наблюдаемых типов организации хроматина в ядре совершенно различны. Объемный фрактал самоподобен на разных масштабах, тогда как логарифмический фрактал иерархически изменяется при масштабировании [5-9].

Структура логарифмического фрактала формируется, на наш взгляд, под влиянием двух факторов: максимизации площади поверхности (доступность для внешних агентов) и

минимизации объема (компактность). Максимально возможная площадь поверхности способствует диффузионным процессам и

счет уменьшения расстояния между ними [5]. А это, в свою очередь, соответствует особому типу самоподобия с аддитивным законом масштабирования, а не мультипликативным, как в случае объемного фрактала.

Что касается мелкомасштабной фрактальной организации, то она имеет структуру, напоминающую кластер диффузионно-ограниченной агрегации и построена так, чтобы максимально облегчить диффузию белков. Результаты данной главы опубликованы в работах [5, 6].

В пятой главе представлены результаты экспериментов по исследованию

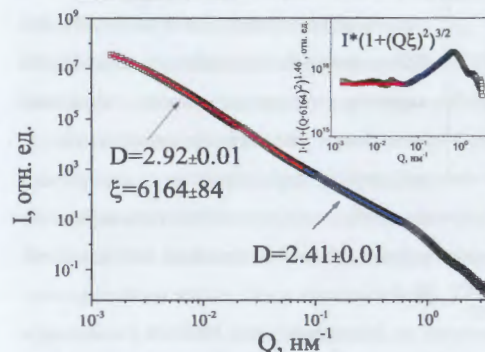


Рис.4 Малоугловое рассеяние нейтронов на ядрах HeLa. Интенсивность рассеяния нейтронов в диапазоне переданных импульсов $1.5 \cdot 10^{-3} + 2 \cdot 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$ — данные установки KWS-3, MLZ, Гархинг, Германия. Интенсивность рассеяния нейтронов в диапазоне переданных импульсов $2 \cdot 10^{-2} + 3 \cdot 10^0 \text{ nm}^{-1}$ — данные установки D11, ILL, Гренобль, Франция.

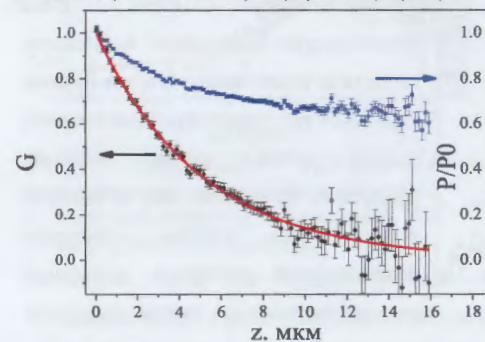


Рис.5 Изменение поляризации P/P_0 и СЭМУРН сигнал G в зависимости от спин-эхо длины z на ядрах HeLa. Данные аппроксимированы функцией $P(z) = \exp(\ln(\exp(-z/\xi)))$, $\xi = (5.1 \pm 0.1) \cdot 10^3 \text{ nm}$, $\sigma = 0.46 \pm 0.01$.

организации хроматина в ядрах HeLa (Рис.4). Интенсивность малоуглового рассеяния нейтронов в диапазоне переданных импульсов $[8 \cdot 10^{-2} + 7 \cdot 10^{-1}] \text{ nm}^{-1}$ описывается степенной функцией $I(Q) \sim Q^{-D}$ со степенью $D = 2.41 \pm 0.01$.

Эта зависимость демонстрирует фрактальную организацию упаковки ДНК в ядре с размерностью равной степени D . Интенсивность рассеяния нейтронов (Рис.4) диапазоне переданных импульсов $[1.5 \cdot 10^{-3} + 8 \cdot 10^{-2}] \text{ nm}^{-1}$ описывается степенной функцией с учетом конечного размера

рассеивателя $I(Q) \sim (1 + (Q\xi)^2)^{D/2}$ со степенью $D = 2.92 \pm 0.01$ и корреляционной длиной $\xi = 6164 \pm 84 \text{ nm}$.

Различие между степенями, обнаруженными в разных диапазонах по переданному импульсу Q , приводит к заключению о том, что фрактальная структура ДНК в ядре меняет свой характер при переходе от малого масштаба (десятки нанометров) к большему масштабу (сотни нанометров). Независимые измерения

по Спин-Эхо МУРН (Рис.5) дают функцию СЭМУРН, которая хорошо описывается экспоненциально затухающей функцией $G(z) = \exp(-z/\xi)$, где $\xi = (5.1 \pm 0.1) \cdot 10^3$ нм - корреляционная длина ядра HeLa в диапазоне спин-эхо длин $[3 \cdot 10^2 \div 1.6 \cdot 10^4]$ нм.

Согласно концепции рассеяния на фрактальных объектах [9] корреляционная функция ядра HeLa на масштабах от 9 нм до 80 нм является степенной функцией $\gamma(r) \sim (r/\xi)^{D-3}$, с $D = 2,41$. Степенная корреляционная функция соответствует

объемной фрактальной структуре с фрактальной размерностью $D_f = 2,41$. На более крупных масштабах, т. е. от 80 нм характер корреляционной функции изменяется на логарифмический $\gamma(r) \sim \ln(\xi/r)$ и простирается вплоть до масштаба, соответствующего корреляционной длине ядра HeLa, равной 5100 нм.

Методами малоуглового рассеяния и конфокальной было установлено, что ядра HeLa агрегируют со временем, взаимопроникая друг в друга. Интенсивность ультра малоуглового рассеяния нейтронов на изолированных (синие точки) и агрегированных (черные точки) ядер HeLa в области малых значений переданного импульса показаны на Рис.6. Кривая рассеяния на агрегированных ядрах HeLa демонстрирует небольшую выпуклость, которая исчезает после того, как образец несколько раз пропустить через шприц с тонкой иглой, иными словами, пропустить суспензию ядер в быстром потоке. Для анализа изменения интенсивности рассеяния, возникшей при агрегации ядер, кривые рассеяния, соответствующие агрегированным ядрам и изолированным были поделены на расчетную кривую рассеяния, которая соответствует ядрам изолированным (Рис. 7). Таким образом был выделен вклад в

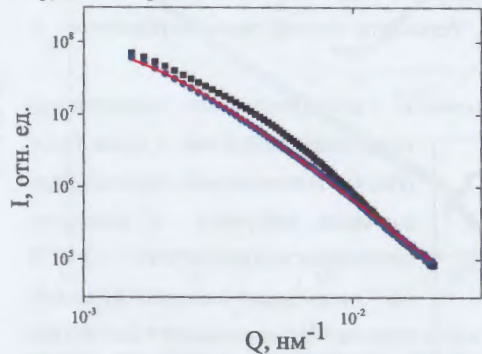


Рис.6 Ультра малоугловое рассеяние нейтронов на изолированных (синие точки) и агрегированных (черные точки) ядер HeLa.

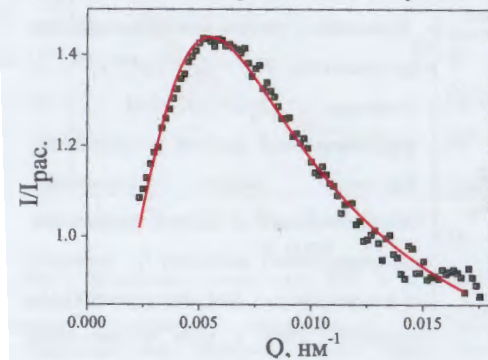


Рис.7 Отношение интенсивности рассеяния на агрегированных ядрах HeLa к интенсивности рассеяния на изолированных ядрах HeLa.

рассеяние, связанный с парной корреляцией между ядрами. Обнаруженный пик можно рассматривать как структурный фактор агрегированных ядер.

Пик на Рис. 7 хорошо описывается функцией Лоренца в логарифмических координатах с центром при $Q=(5.5 \pm 0.3) \cdot 10^{-3}$ нм⁻¹. Положение максимума пика соответствует корреляции на расстоянии порядка 1 микрон, в то время, как размер самого ядра чуть больше 6 микрон. Принимая во внимание то, что ядра фиксированы и с самим ядром ничего происходить не может и тот факт, что агрегация ядер дает корреляционный пик на масштабах в пять раз меньших размера самого ядра, логично предположить, ядра HeLa проникают друг в друга при агрегации.

Изменение корреляционной функции СЭМУРН при агрегации можно рассматривать с точки зрения дополнительного рассеяния нейтронов на корреляциях ядрах. В этом случае функция, связанная с агрегацией, может быть извлечена путем деления одного набора данных на другой. На Рис. 8 представлено отношение рассчитанной по выражению поляризации, соответствующей изолированным ядрам HeLa к экспериментальной поляризации соответствующей агрегированным ядрам HeLa (черные точки) и изолированным ядрам HeLa (синие точки). Таким образом, может быть выделен вклад в функцию СЭМУРН от агрегированных (взаимопроникающих) ядер. Выделенный вклад может быть также хорошо аппроксимирован функцией Лоренца в логарифмических

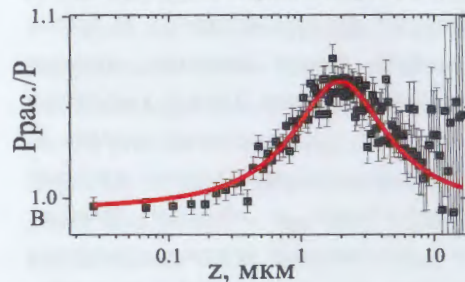


Рис.8 Отношение рассчитанной поляризации на изолированных ядрах HeLa к экспериментальной поляризации для агрегированных ядер HeLa.

стандартной функцией (функция Лоренца), но в логарифмическом масштабе. Это может быть связано с тем, что логарифмически растянутая вдоль оси абсцисс функция Лоренца должен быть тесно связан с логарифмическим характером корреляционной функции. Иначе говоря, если объекты с внутренней структурой, которая описывается логарифмической корреляционной функцией, взаимопроникают, то они дают парную корреляционную функцию, которая описывается функцией Лоренца в логарифмическом масштабе. Результаты данной главы опубликованы в работе [7].

В шестой главе рассмотрены две физические модели для описания крупномасштабной структуры хроматина в ядре биологической клетки, находящейся в интерфазном состоянии: модель фрактальной глобулы и модель логарифмического фрактала. Основываясь на классификации фрактальных объектов, разработанной с помощью метода малоуглового рассеяния нейтронов (МУРН), показано, что модель фрактальной глобулы не удовлетворяет экспериментальным данным малоуглового рассеяния нейтронов на ядрах биологических клеток. Напротив, модель логарифмического фрактала хорошо описывает экспериментальные данные МУРН, а, следовательно, и является хорошим приближением для описания крупномасштабной структуры хроматина. Модель логарифмического фрактала предсказывает, что ядерное пространство заполнено хроматином ровно наполовину, в то время как остальная его половина составляет межхроматиновые пустоты, заполненные нуклеоплазмой, в которой осуществляются различные ядерных процессы. Таким образом, в структурной организации хроматина сбалансированы две противоборствующие тенденции: увеличение площади поверхности хроматина в ядре клетки (доступности для внешних агентов) и уменьшение объема занимаемого хроматином (компактности ядра). Результаты данной главы опубликованы в работе [8].

В заключении сформулированы основные результаты работы:

1. Представлен подход для расчета корреляционной функции, основанный на анализе сечения рассеяния. В этом подходе профиль сечения рассеяния нейтронов рассматривается как наблюдаемое свойство фрактальной частицы. В модели учитываются два основных параметра частицы: конечный размер ξ и фрактальный параметр D , детектируемые через призму малоуглового нейтронного рассеяния. Описание охватывает в единой картине поверхностные, логарифмический и объемные фракталы. Корреляционная функция $\gamma(r)$ для объемных и поверхностных фракталов описывается общим выражением и пропорциональна функции Макдональда $(D-3)/2$ -го порядка, помноженной на степенную функцию $r^{(D-3)/2}$. При $2 < D < 3$ корреляционная функция соответствует объемному фракталу с $D = D_m$, при $D = 3$ – логарифмическому, при $3 < D < 4$ – поверхностному с $D = 6 - D_s$ (D_m и D_s – фрактальные размерности объемного и поверхностного фрактала). Кроме того, корреляционные функции для неограниченных фракталов, как объемных, так и поверхностных, совпадают с асимптотикой полученного выражения при $r/\xi < 1$, где ξ – корреляционная длина частицы. Также получено выражение для одномерной корреляционной функции $G(z)$, которая измеряется в методе спин-эхо малоуглового рассеяния нейтронов. Функция спин-эхо длины фрактального

объекта описывается аналогичным выражением, со сдвигом индекса функции Макдональда и показателя степенной функции на $1/2$.

2. Обнаруженные показатели в степенном законе интенсивности рассеяния на ядрах HeLa аналогичны таковым при рассеянии на ядрах куриных эритроцитов и подкрепляют общую гипотезу о би-фрактальной структуре хроматина в интерфазных ядрах. Мелкомасштабная фрактальная структура соответствует объемному фракталу с размерностью $D_F = 2,41$, а крупномасштабная соответствует логарифмическому фракталу с корреляционной функцией $\gamma(r) \sim \ln(\xi/r)$. Объемный фрактал самоподобен на разных масштабах, тогда как логарифмический фрактал иерархически изменяется при масштабировании. В результате логарифмический фрактал является более компактным, чем объемный фрактал, но он все еще имеет довольно большую площадь поверхности, что обеспечивает доступность на всех масштабах длины. Очевидно, что такая би-фрактальная организация хроматина является результатом эволюционного процесса оптимизации компактности и доступности упаковки генов. Мелкомасштабная фрактальная организация построена так, чтобы максимально облегчить диффузию белков, в то время как крупномасштабная логарифмического фрактала формируется под влиянием двух факторов: диффузии белков и взаимодействия генов.

3. Структура логарифмического фрактала в ядрах HeLa простирается на две декады, в то время как объемный фрактал распространяется только на одну. В ядрах куриных эритроцитов все обстоит с точностью до наоборот: логарифмический фрактал встречается в пределах одной декады, а объемный фрактал распространен на две. Мы предполагаем, что это различие связано с тем, что ядро куриного эритроцита никогда не переходит в митотическую фазу и никогда не делится, а ядро HeLa делится. Это также может быть связано с эпистазом: ядра, в которых происходит большое количество взаимодействий между локусами, имеют более длинный диапазон логарифмического фрактала.

4. В отличие от ядер куриных эритроцитов, ядра HeLa имеют тенденцию агрегироваться во времени. Большой диапазон распространения логарифмической фрактальной структуры крупномасштабной организации хроматина позволяет ядру HeLa глубоко проникать в соседнее ядро в процессе агрегации. Феномен взаимопроникновения ядер HeLa показывает, что свободное от хроматина пространство одного ядра может быть занято не чем-то пренебрежимо малым: оно равно по объему, занимаемому самим хроматином. Свободное пространство внутри ядра необходимо для процесса синтеза ДНК, во время S-фазы, когда в одном и том же объеме ядра ДНК.

Благодарности

Автор благодарит Григорьева Сергея Валентиновича за научное руководство, терпение и неоценную помощь в ходе выполнения настоящей работы.

Автор выражает благодарность сотрудникам Петербургского Института Ядерной Физики имени Б. П. Константинова НИЦ Ки Михаила Валентиновича Филатова, Римму Альбертовну Пантину и Елену Юрьевну Варфаломееву за предоставленные образцы ядер клеток и их аттестацию с помощью проточной цитометрии и конфокальной микроскопии, а также за плодотворное обсуждение полученных результатов. Автор выражает признательность Виму Боуману и Крису Дайфу (Технический Университет Делфта) за помощь в проведении экспериментов по спин-эхо малоугловому рассеянию нейтронов, а также, Виталию Пипичу (Центр Хайнца Майера-Лейбница), Баохау Ву (Центр Хайнца Майера-Лейбница), Дирку Хонекеру (Институт Лауз-Ланжевена), Анни Бруле (Лаборатория Леона Бриллюэна) за помощь в проведении экспериментов по малоугловому рассеянию нейтронов. Кроме того, автор благодарит своих родных и близких за участие и моральную поддержку.

Публикации автора по теме диссертации

- 1) Iashina E. G. et al. Small-angle neutron scattering (SANS) and spin-echo SANS measurements reveal the logarithmic fractal structure of the large-scale chromatin organization in HeLa nuclei // *Journal of Applied Crystallography*. – 2019. – Т. 52. – №. 4. – С. 844-853.
- 2) Яшина Е. Г., Григорьев С. В. Крупномасштабная структура хроматина: фрактальная глобула или логарифмический фрактал? // *Журнал экспериментальной и теоретической физики*. – 2019. – Т. 156 – №. 3 (9). – С. 540–544.
- 3) Iashina E. G. et al. Additive scaling law for structural organization of chromatin in chicken erythrocyte nuclei // *Physical Review E*. – 2017. – Т. 96. – №. 1. – С. 012411.
- 4) Iashina E. G. et al. Spin-echo small-angle neutron scattering study of the structure organization of the chromatin in biological cell // *Journal of Physics: Conference Series*. – IOP Publishing, 2017. – Т. 862. – №. 1. – С. 012010.
- 5) Яшина Е. Г., Григорьев С. В. Малоугловое рассеяние нейтронов на фрактальных объектах // *Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования*. – 2017. – №. 9. – С. 5-16.

Список литературы

- [1] West G. B., Brown J. H., Enquist B. J. The fourth dimension of life: fractal geometry and allometric scaling of organisms // *science*. – 1999. – Т. 284. – №. 5420. – С. 1677-1679.
- [2] Eloy C. Leonardo's rule, self-similarity, and wind-induced stresses in trees // *Physical review letters*. – 2011. – Т. 107. – №. 25. – С. 258101.

[3] Rekveldt M. T. Novel SANS instrument using neutron spin echo // *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*. – 1996. – Т. 114. – №. 3-4. – С. 366-370.

[4] Krouglov T. et al. Structural transitions of hard-sphere colloids studied by spin-echo small-angle neutron scattering // *Journal of Applied Crystallography*. – 2003. – Т. 36. – №. 6. – С. 1417-1423.

[5] Iashina E. G. et al. Additive scaling law for structural organization of chromatin in chicken erythrocyte nuclei // *Physical Review E*. – 2017. – Т. 96. – №. 1. – С. 012411.

[6] Iashina E. G. et al. Spin-echo small-angle neutron scattering study of the structure organization of the chromatin in biological cell // *Journal of Physics: Conference Series*. – IOP Publishing, 2017. – Т. 862. – №. 1. – С. 012010.

[7] Iashina E. G. et al. Small-angle neutron scattering (SANS) and spin-echo SANS measurements reveal the logarithmic fractal structure of the large-scale chromatin organization in HeLa nuclei // *Journal of Applied Crystallography*. – 2019. – Т. 52. – №. 4. – С. 844-853.

[8] Яшина Е. Г., Григорьев С. В. Крупномасштабная структура хроматина: фрактальная глобула или логарифмический фрактал? // *Журнал экспериментальной и теоретической физики*. – 2019. – Т. 156 – №. 3 (9). – С. 540–544.

[9] Яшина Е. Г., Григорьев С. В. Малоугловое рассеяние нейтронов на фрактальных объектах // *Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования*. – 2017. – №. 9. – С. 5-16.

... (mirrored text from the reverse side of the page) ...

Отпечатано в типографии НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ
188300, Гатчина Ленинградской обл., мкр. Орлова роща, д. 1
Зак. 101, тир. 100, уч.-изд. л. 1; 28.02.2020 г.